

PCT/JP00/01353
06.03.00

日 本 国 特 許 庁
PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

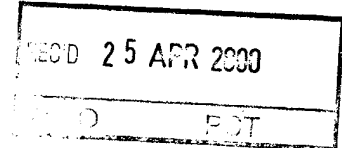
JP00/01353

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application:

1999年 3月 5日



出 願 番 号
Application Number:

平成11年特許願第059361号

出 願 人
Applicant(s):

三菱レイヨン株式会社

E.KU

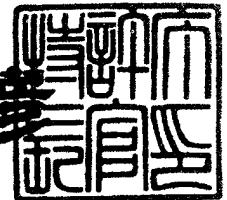
PRIORITY
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年 4月 7日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

近 藤 隆 彦



出証番号 出証特2000-3023262

特平 11-059361

【書類名】 特許願

【整理番号】 P99-0105

【提出日】 平成11年 3月 5日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12N 15/11

【発明の名称】 核酸固定化中空繊維並びに核酸固定化中空繊維配列体及びその薄片

【請求項の数】 6

【発明者】

【住所又は居所】 広島県大竹市御幸町 20 番 1 号 三菱レイヨン株式会社
中央技術研究所内

【氏名】 秋田 隆

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県横浜市鶴見区大黒町 10 番 1 号 三菱レイヨン
株式会社 化学品開発研究所内

【氏名】 湯 不二夫

【特許出願人】

【識別番号】 000006035

【氏名又は名称】 三菱レイヨン株式会社

【代理人】

【識別番号】 100091096

【弁理士】

【氏名又は名称】 平木 祐輔

【選任した代理人】

【識別番号】 100096183

【弁理士】

【氏名又は名称】 石井 貞次

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 015244

特平 1 1 - 0 5 9 3 6 1

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 核酸固定化中空繊維並びに核酸固定化中空繊維配列体及びその薄片

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 核酸が固定化された中空繊維。

【請求項 2】 請求項 1 記載の繊維の束を含む核酸固定化中空繊維配列体。

【請求項 3】 繊維配列体中の各繊維が規則的に配列されたものである請求項 2 記載の核酸固定化中空繊維配列体。

【請求項 4】 繊維の束が、 1 cm^2 あたり 100 本以上の中空繊維を含むものである請求項 2 又は 3 記載の核酸固定化中空繊維配列体。

【請求項 5】 核酸の種類が、各繊維の全部又は一部において異なるものである請求項 2～4 のいずれか 1 項に記載の核酸固定化中空繊維配列体。

【請求項 6】 請求項 2～5 のいずれか 1 項に記載の核酸固定化中空繊維配列体の繊維軸と交差する切断面を有する、前記核酸固定化中空繊維配列体の薄片。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、核酸が固定化された高分子材料に関する。詳しくは、核酸が固定化された中空繊維並びに核酸が固定化された中空繊維配列体及びその薄片に関する。

【0002】

【従来の技術】

近年、各種生物におけるゲノムプロジェクトが進められており、ヒト遺伝子をはじめとして、多数の遺伝子とその塩基配列が急速に明らかにされつつある。配列の明らかにされた遺伝子の機能については、各種の方法で調べることができるが、その有力な方法の一つとして、明らかにされた塩基配列情報を利用した遺伝子発現解析が知られている。例えば、ノーザンハイブリダイゼーションに代表されるような、各種の核酸：核酸間ハイブリダイゼーション反応や各種のPCR反応

を利用した方法が開発され、当該方法により各種遺伝子とその生体機能発現との関係を調べることができる。しかしながら、これらの方法では適用し得る遺伝子の数に制限がある。したがって、今日のゲノムプロジェクトを通して明らかにされつつあるような、一個体レベルという極めて多数の遺伝子から構成される複雑な反応系全体からみると、上記方法により遺伝子の総合的・系統的解析を行うことは困難である。

最近になって、多数遺伝子の一括発現解析を可能とするDNAマイクロアレイ法（DNAチップ法）と呼ばれる新しい分析法、ないし方法論が開発され、注目を集めている。

【0003】

これらの方法は、いずれも核酸：核酸間ハイブリダイゼーション反応に基づく核酸検出・定量法である点で原理的には従来の方法と同じであるが、マイクロアレイ又はチップと呼ばれる平面基盤片上に、多数のDNA断片が高密度に整列固定化されたものが用いられている点に大きな特徴がある。マイクロアレイ法の具体的使用法としては、例えば、研究対象細胞の発現遺伝子等を蛍光色素等で標識したサンプルを平面基盤片上でハイブリダイゼーションさせ、互いに相補的な核酸（DNAあるいはRNA）同士を結合させ、その箇所を蛍光色素等でラベル後、高解像度解析装置で高速に読みとる方法が挙げられる。こうして、サンプル中のそれぞれの遺伝子量を迅速に推定できる。即ち、この新しい方法の本質は、基本的には反応試料の微量化と、その反応試料を再現性よく多量・迅速・系統的に分析、定量しうる形に配列・整列する技術との統合であると理解される。

核酸を基盤上に固定化するための技術としては、上記ノーザン法同様、ナイロンシート等の上に高密度に固定化する方法の他、更に密度を高めるため、ガラス等の基盤の上にポリリジン等をコーティングして固定化する方法、あるいはシリコン等の基盤の上に短鎖の核酸を直接固相合成していく方法などが開発されている。

【0004】

しかし、例えば、ガラス等の固体表面を化学的又は物理的に修飾した基盤上に核酸をスポッティング固定化する方法[Science 270, 467-470(1995)]は、スポッ

ト密度でシート法より優れるものの、スポット密度及びスポット当たり固定できる核酸量がシリコン基盤上における直接合成法(U.S. Patent 5,445,934、U.S. Patent 5,774,305)と比較して少量であり、再現が困難である点が指摘されている。他方、シリコン等の基盤の上にフォトリソグラフィ技術を用い、多種の短鎖核酸をその場で規則正しく固相合成していく方法に関しては、単位面積あたりに合成しうる核酸種数(スポット密度)及びスポット当たりの固定化量(合成量)、並びに再現性等において、スポットティング法より優れるとされるものの、固定化しうる化合物種は、フォトリソグラフィにより制御可能な比較的短鎖の核酸に限られる。さらに、高価な製造装置と多段の製造プロセスにより、チップ当たりの大きなコストダウンが困難とされる。その他、微小な担体上に核酸を固相合成しライブラリー化する手法として、微小なビーズを利用する方法が知られている。この方法は、チップ法より長鎖の核酸を多種・安価に合成することが可能であり、またcDNA等より長鎖の核酸も固定可能と考えられる。しかしながら、チップ法と異なり、指定の化合物を指定の配列基準で再現性よく整列させたものを作製することは困難である。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】

このような状況下、鎖長によらず核酸を所定の濃度に固定化でき、測定可能な形に高密度に再現よく配列化可能で、安価な大量製造に適応しうる新たな体系的な方法論の確立は、今後重要性を増すと考えられる遺伝子解析に強く求められるものであり、本発明が解決しようとする課題である。

【0006】

具体的には、本発明が解決しようとする課題は、ナイロンシートやガラス基盤のような二次元担体上への微量スポットティングや微量分注による核酸配列体製造法に比べ、核酸固定化量が高く、単位面積あたり配列される核酸分子種の高密度化が可能で、大量生産により適した配列体、すなわち核酸が固定化された二次元的(平面的)配列体(固定化核酸二次元配列体という)の製造法の確立である。また、本発明が解決しようとする課題はシリコン基盤上へのフォトリソグラフィと固相合成との組み合わせによる高密度オリゴ核酸配列体製造法と比べ、cD

NAを含む長鎖の核酸にも適応可能で、製造コストのより低い固定化核酸二次元配列体製造法の確立である。

そこで、本発明は、核酸が固定化された中空繊維並びに核酸が固定化された中空繊維配列体及びその薄片を提供することを目的とする。

【0007】

【課題を解決するための手段】

本発明者等は、上述の如き課題を解決すべく、鋭意検討を重ねた結果、核酸整列化プロセスと固定化プロセスとを同一の二次元担体上で行う従来法の発想を改め、核酸の固定化プロセスを一次元構造体としての繊維上（1本の繊維上）に独立して行い、それらの整列化プロセスに各種の繊維賦形化技術を導入することにより三次元構造体としての繊維束を作製し、得られる繊維束の切片化プロセスを経ることで、固定化核酸二次元高密度配列体を作製し得ることを見だし、本発明を完成するに至った。

【0008】

すなわち、本発明は、核酸が固定化された中空繊維である。

さらに、本発明は、前記中空繊維の束を含む核酸固定化中空繊維配列体である。該配列体としては、例えば配列体中の中空繊維が規則的に配列されたものが挙げられ、 1 cm^2 あたり100本以上の中空繊維を含むものが挙げられる。また、これらの中空繊維に固定化された核酸の種類としては、各中空繊維の全部又は一部において異なるものが挙げられる。

さらに、本発明は、前記核酸固定化中空繊維配列体の繊維軸と交差する切断面を有する、前記核酸固定化中空繊維配列体の薄片である。

【0009】

【発明の実施の形態】

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明において、繊維に固定化する対象となる核酸としては、デオキシリボ核酸（DNA）やリボ核酸（RNA）が挙げられる。本発明に用いる核酸は、市販のものでもよく、また、生細胞などから得られた核酸でもよい。

【0010】

生細胞からのDNA又はRNAの調製は、公知の方法、例えばDNAの抽出については、Blinらの方法（Blin et al., Nucleic Acids Res. 3: 2303 (1976)）等により、また、RNAの抽出については、Favaloroらの方法（Favaloro et al., Methods Enzymol. 65: 718 (1980)）等により行うことができる。固定化する核酸としては、更に、鎖状若しくは環状のプラスミドDNAや染色体DNA、これらを制限酵素により若しくは化学的に切断したDNA断片、試験管内で酵素等により合成されたDNA、あるいは、化学合成したオリゴヌクレオチド等を用いることもできる。

【0011】

本発明では、核酸をそのまま中空繊維に固定化してもよく、また、核酸に化学的修飾を施した誘導体や、必要に応じて変成させた核酸を固定化してもよい。

核酸の化学的修飾には、アミノ化、ビオチン化、ディゴキシゲニン化等が知られており[Current Protocols In Molecular Biology, Ed.; Frederick M. Ausubel et al.(1990)、脱アイソトープ実験プロトコール(1)DIGハイブリダイゼーション（秀潤社）]、本発明ではこれらの修飾法を採用することができる。一例として、核酸へのアミノ基導入に関して説明する。

【0012】

アミノ基を有する脂肪族炭化水素鎖と一本鎖核酸との結合位置は特に限定されるものではなく、核酸の5'末端または3'末端のみならず核酸の鎖中（例えば、リン酸ジエステル結合部位または塩基部位）であってもよい。この一本鎖核酸誘導体は、特公平3-74239号公報、米国特許4,667,025号、米国特許4,789,737号等に記載の方法にしたがって調製することができる。この方法以外にも、例えば、市販のアミノ基導入用試薬[例えば、アミノリンクII（商標名）；PEバイオシステムズジャパン社、Amino Modifiers（商標名）；クロンテック社]などを用いて、又はDNAの5'末端のリン酸にアミノ基を有する脂肪族炭化水素鎖を導入する周知の方法（Nucleic Acids Res., 11(18), 6513-(1983)）にしたがって調製することができる。

【0013】

本発明において、核酸の固定化に用いることができる中空繊維としては、合成繊維、半合成繊維、再生繊維、天然繊維等が挙げられる。

合成繊維の代表例としては、ナイロン6、ナイロン66、芳香族ポリアミド等のポリアミド系の各種繊維、ポリエチレンテレフタレート、ポリブチレンテレフタレート、ポリ乳酸、ポリグリコール酸等のポリエステル系の各種繊維、ポリアクリロニトリル等のアクリル系の各種繊維、ポリエチレンやポリプロピレン等のポリオレフィン系の各種繊維、ポリビニルアルコール系の各種繊維、ポリ塩化ビニリデン系の各種繊維、ポリ塩化ビニル系繊維、ポリウレタン系の各種繊維、フェノール系繊維、ポリフッ化ビニリデンやポリテトラフルオロエチレン等からなるフッ素系繊維、ポリアルキレンパラオキシベンゾエート系の各種繊維などが挙げられる。

【0014】

半合成繊維の代表例としては、ジアセテート、トリアセテート、キチン、キトサン等を原料としたセルロース系誘導体系各種繊維、プロミックスと称される蛋白質系の各種繊維などが挙げられる。

再生繊維の代表例としては、ビスコース法や銅-アンモニア法、あるいは有機溶剤法により得られるセルロース系の各種再生繊維（レーヨン、キュプラ、ポリノジック等）などが挙げられる。

【0015】

天然繊維の代表例としては、亜麻、苧麻、黄麻などが挙げられる。これらの植物繊維は、中空状の繊維形態を示すので本発明に用いることができる。

天然繊維以外の中空繊維は、特殊なノズルを用いて公知の方法で製造することができる。ポリアミド、ポリエステル、ポリオレフィン等は熔融紡糸法が好ましく、ノズルとしては馬蹄型やC型ノズル、2重管ノズルなどを使用することができる。本発明においては、連続した均一な中空部を形成させることができる点で2重管ノズルを用いるのが好ましい。

【0016】

熔融紡糸ができない合成高分子、半合成繊維又は再生繊維に用いられる高分子

の紡糸は溶剤紡糸が好ましく用いられる。この場合も、溶融紡糸と同じく2重管ノズルを用いて、中空部に芯材として適切な液体を充填しながら紡糸することにより連続した中空部を有する中空繊維を得ることができる。

本発明に用いる繊維は、特にその形態が規定されるものではない。また、モノフィラメントであってもよく、マルチフィラメントであってもよい。さらに、短繊維を紡績した紡績糸でもよい。尚、マルチフィラメントや紡績糸の繊維を用いる場合には、核酸の固定に、単繊維間の空隙等を利用することも可能である。

【0017】

本発明に用いる中空繊維は、無処理の状態でそのまま用いてもよいが、必要に応じて、反応性官能基を導入したものであってもよく、また、プラズマ処理や γ 線、電子線などの放射線処理を施したものであってもよい。

これら中空繊維に核酸を固定化する方法としては、中空繊維の中空部に核酸を含む試料を注入した後、中空繊維の内壁面と核酸との間の各種化学的又は物理的な相互作用、すなわち、中空繊維の内壁面に存在する官能基と核酸のヌクレオチド、ヌクレオシドを構成する成分との間の化学的又は物理的な相互作用を利用することができる。

【0018】

例えば、無修飾の核酸を中空繊維に固定化する場合には、核酸と中空繊維とを作用させた後、ベーキングや紫外線照射により固定できる。また、アミノ基で修飾された核酸を中空繊維に固定化する用いる場合には、グルタルアルデヒドや1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(EDC)等の架橋剤を用いて繊維の官能基と結合させることができる。

核酸を含む試料を中空繊維に作用させる際の温度は、5℃～95℃が好ましく、15℃～60℃が更に好ましい。処理時間は通常5分～24時間であり、1時間以上が好ましい。

【0019】

中空繊維の場合、上述のごとく中空部分に核酸を固定化できるのが特徴である。但し、本発明においては、内壁部に固定化したのと同様、その繊維の外壁部にも固定することができる。従って、繊維断面から見れば外壁部及び内壁部の両方

に固定化が可能であり、単位断面積あたりの核酸固定量が通常の繊維に比べて大きくできることが特徴である。また、内壁部だけに核酸を固定した場合は、配列体を作製（後述）するときに使用する接着剤が付着しないため、有効に（接着剤の影響を受けることなく正確に）固定化核酸プローブとして使用することができる。

【0020】

上述の方法により得られた核酸固定化中空繊維は、適当な処理をすることができる。例えば、熱処理、アルカリ処理、界面活性剤処理などを行うことにより、中空繊維の内壁面に固定化された核酸を変成させる。あるいは、細胞、菌体などの生材料から得られた核酸を使用する場合は、不要な細胞成分などを除去する。そして、処理後の繊維を核酸を検出する材料として用いることができる。なお、これらの処理は別々に実施してもよく、同時に実施してもよい。また、核酸を含む試料を中空繊維内部に固定化する前に、適宜実施してもよい。

【0021】

上記の通り調製された核酸固定化中空繊維は、本発明の繊維配列体を構成する基本単位とすることができる。そして、これらの核酸固定化中空繊維を集束した後、接着して、繊維配列体となすことができる。この際、核酸固定化中空繊維を規則的に配列し、樹脂接着剤等で接着することにより、例えば、縦横に核酸固定化中空繊維が整然と規則的に配列した核酸固定化中空繊維配列体を得ることができる。中空繊維配列体の形状は特に限定されるものではないが、通常は、繊維を規則的に配列させることにより正方形又は長方形に形成される。

【0022】

「規則的に」とは、一定の大きさの枠の中に含まれる繊維の本数が一定となるように順序よく配列させることをいう。例えば、直径1mmの繊維を束にして断面が縦10mm、横10mmの正方形となるように配列させようとする場合は、その正方形の枠内（ 1 cm^2 ）における1辺に含まれる繊維の数を10本とし、この10本の繊維を1列に束ねて1層のシートとした後、このシートが10層になるように重ねる。その結果、縦に10本、横に10本、合計100本の繊維を配列させることができる。但し、繊維を規則的に配列させる手法は、上記のようにシートを重ね

するものに限定されるものではない。

【0023】

この場合に、特定の核酸が固定化された繊維の位置があらかじめ決められた状態で配列することが望ましいが、必ずしもそのように配列させる必要はない。その理由は、配列体を形成した段階では特定の核酸を固定化した繊維がどの位置に存在するのかが不明でも、配列体の断面を切断した後、一旦ハイブリダイゼーション手法等を用いて断面における核酸の配置位置を決定することにより、特定の核酸が固定された繊維の位置を確認することができるためである。従って、この手法を用いて、一度、薄片内に配置された複数種類の核酸の位置を決定しておけば、同一配列体から得られる薄片はすべて同一の位置配置であるので、同一配列体から得られるすべての薄片の核酸の位置配置がわかる。

【0024】

なお、本発明において束にする繊維の本数は100本以上、好ましくは1,000~10,000,000本であり、目的に応じて適宜設定することができる。但し、配列体における繊維の密度が、 1 cm^2 当たり100~1,000,000本となるように調製することが好ましい。そして、高密度に核酸が固定化された繊維配列体の薄片を得るべく繊維を配列させるためには、繊維の太さは細い方が好ましい。本発明の好ましい実施態様においては、繊維1本の太さは1mm以下であることが必要である。

【0025】

本発明において直径 $50\text{ }\mu\text{m}$ のモノフィラメントを用いた場合、 1 cm あたり200本の繊維を配列させることができるため、 1 cm^2 の正方形内に配列させることのできる繊維の本数は40,000本である。したがって、この場合は 1 cm^2 あたり最高40,000種類の核酸を固定化することができる。

各繊維配列体中の各々の中空繊維内部に固定化されている核酸の種類は、それぞれ異なる種類の核酸とすることが可能であり、また、同一の核酸が固定化された繊維から任意の本数の繊維を選択し、その選択された繊維を束ねて適宜配列させることも可能である。即ち、本発明によれば、固定化された核酸の種類と配列の順序に関しては、目的に応じて任意に設定することが可能である。

【0026】

本発明においては、上述の核酸固定化中空繊維配列体を繊維軸と交差する方向、好ましくは繊維軸に対して垂直方向に切断することにより、任意に配列された核酸固定化中空繊維配列体断面を有する薄片を得ることができる。この際の切断方法としては、例えば、ミクロトームを用いて配列体から薄片を切り出す方法等が挙げられる。薄片の厚みに関しては任意に調整することができるが、通常1～5,000 μ m、好ましくは10～2,000 μ mである。

【0027】

得られた核酸固定化中空繊維配列体断面を有する薄片には、該配列体を構成する中空繊維の数に応じた核酸が存在する。薄片の断面積あたりの核酸の数に関しては、用いる中空繊維の外径や配列体作製時の方法等を適宜選択することにより、薄片断面積1 cm^2 あたり100個以上の核酸が固定化された薄片を作製することが可能であり、更には、薄片断面積1 cm^2 あたり1000個以上の核酸が固定化された薄片を作製することも可能である。

【0028】

得られた核酸固定化中空繊維配列体断面を有する薄片は、固定化された核酸をプローブとして、検体と反応させてハイブリダイゼーションを行うことにより、検体中の特定のポリヌクレオチドの塩基配列の検出に用いることができる。本発明で言うプローブとは、検出すべき遺伝子の塩基配列に相補的な塩基配列を有する核酸を指す。即ち、本発明の核酸固定化中空繊維配列体断面を有する薄片を検体と反応させてハイブリダイゼーションを行い、プローブと相補的な検体中に存在する核酸とのハイブリッドを形成させ、このハイブリッドを検出することにより、目的とする塩基配列を有する検体中の核酸を検出することができる。

【0029】

ハイブリッドの検出には、ハイブリッドを特異的に認識することができる公知の手段を用いることができる。例えば、検体中の核酸に、蛍光物質、発光物質、ラジオアイソトープなどの標識体を作用させ、この標識体を検出することができる。これら標識体の種類や標識体の導入方法等に関しては、何ら制限されることはなく、従来公知の各種手段を用いることができる。

【0030】

これら薄片は、固定化された核酸をプローブとして、検体と反応させてハイブリダイゼーションを行うことにより、検体中の特定の塩基配列を有する核酸の検出に用いることができる。本発明で言うプローブとは、狭義には検出すべき遺伝子の塩基配列に相補的な塩基配列を有する核酸を指す。即ち、本発明の核酸固定化中空繊維配列体断面を有する薄片を検体と反応させてハイブリダイゼーションを行い、プローブと相補的な検体中に存在する核酸とのハイブリッドを形成させ、このハイブリッドを検出することにより、目的とする塩基配列を有する検体中の核酸を検出することができる。また、本発明で言うプローブとは、広義には検体中に存在するタンパク質や低分子化合物等と特異的に結合することができる核酸を指す。従って、これらの薄片の利用法としては、固定化された核酸（プローブ）とハイブリッドを形成する核酸を検出するための利用に留まらず、固定化された核酸と特異的に結合するタンパク質や低分子化合物等の各種試料（例えば生体成分等）を検出するための利用が挙げられる。

【0031】

固定化された核酸とハイブリッドを形成する核酸や、固定化された核酸と特異的に結合する各種生体成分の検出には、公知の手段を用いることができる。例えば、検体中の核酸、タンパク質又は低分子化合物等に、蛍光物質、発光物質、ラジオアイソトープなどの標識体を作用させ、この標識体を検出することができる。これら標識体の種類や標識体の導入方法等に関しては、何ら制限されることはなく、従来公知の各種手段を用いることができる。

【0032】

【実施例】

本発明を以下の実施例によって更に詳細に説明する。但し、本発明はこれら実施例によりその技術的範囲が限定されるものではない。

参考例 1

中空繊維の前処理（1）：

ナイロン製中空繊維（外径約 300 μm ）約 1 m の中空部に、室温の蟻酸（純度 99%）0.1 ml を注入し、10 秒間保持した。次に、中空部に室温の水を

多量に注入して十分洗浄後、乾燥して、ナイロン製中空繊維の前処理を行った。

【0033】

参考例 2

中空繊維の前処理 (2) :

蟻酸 (純度 99%) の代わりに、硫酸の 10% エタノール溶液を用いた以外は、実施例 1 と同様にナイロン製中空繊維の前処理を行った。

【0034】

参考例 3

5' 末端にアミノ基を有するオリゴヌクレオチドの調製:

以下に示したオリゴヌクレオチド (プローブ A、プローブ B) を合成した。

プローブ A: GCGATCGAAACCTTGCTGTACGAGCGAGGGCTC (配列番号 1)

プローブ B: GATGAGGTGGAGGTCAGGGTTTGGGACAGCAG (配列番号 2)

【0035】

オリゴヌクレオチドの合成は PE バイオシステムズ社の自動合成機 DNA/RNA synthesizer (model 394) を用いて行い、DNA 合成の最終ステップでアミノリンク II (商標名) (アプライドバイオシステム社) を用いてそれぞれのオリゴヌクレオチドの 5' 末端に $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_6-$ を導入し、一般的手法により、脱保護及び精製して使用した。

【0036】

実施例 1

核酸固定化中空繊維の作製 (1) :

参考例 1 及び参考例 2 で前処理したナイロン製中空繊維に対し、参考例 3 において作製したにアミノ基を有するオリゴヌクレオチド (プローブ A 及びプローブ B) をそれぞれ、以下の方法により中空繊維内部に固定化した。

【0037】

10 mM リン酸カリウム溶液 (pH8) 緩衝液に、参考例 3 において作製したにアミノ基を有するオリゴヌクレオチド (0.1~30 mM) を加えた溶液を、実施例 1 及び実施例 2 で前処理したナイロン製中空繊維に注入した後、20℃ で終夜反応を行った。反応後、10 mM リン酸カリウム溶液 (pH8) 緩衝液、1M リン酸カリウム溶液 (pH8)

緩衝液、1M KCl溶液、水で、中空繊維を洗浄し、オリゴヌクレオチドが中空繊維の内壁面に固定化された核酸固定化中空繊維を得た（図1）。図1において、(1)はプローブAが固定された中空繊維、(2)はプローブBが固定された中空繊維を表す。また、(3)及び(4)の繊維束のうち白丸（○）で表示した繊維はプローブAが固定化されたものを、黒丸（●）で表示した繊維はプローブBが固定されたものを表す。

【0038】

実施例2

核酸固定化中空繊維の作製（2）：

参考例1及び参考例2で前処理したナイロン製中空繊維に対し、参考例3において作製したにアミノ基を有するオリゴヌクレオチド（プローブA及びプローブB）をそれぞれ、以下の方法により中空繊維内部に固定化した。

【0039】

参考例3において作製したにアミノ基を有するオリゴヌクレオチドの溶液（核酸濃度 $10\mu\text{g/ml}$ 、溶媒として 0.1M MgCl_2 を含むリン酸緩衝液—生理食塩水を使用）の $2500\mu\text{l}$ と、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド(EDC)の 0.06g とを混合した溶液を、参考例1及び参考例2で前処理したナイロン中空繊維に注入した。その後、 $1/15\text{ mol/l}$ リン酸塩緩衝液（ $\text{pH}8.0$ ）で洗浄し、同緩衝液 5 ml に浸した。これに、EDCの 0.12g を加え、室温で3時間振とうした後、 $1/15\text{ mol/l}$ リン酸塩緩衝液（ $\text{pH}8.0$ ）で更に洗浄し、オリゴヌクレオチドが中空繊維の内壁面に固定化された核酸固定化中空繊維を得た。

【0040】

実施例3

核酸固定化中空繊維の作製（3）：

ナイロン製中空繊維の代わりに、表面を親水化処理したポリエチレン製中空繊維（外径約 $300\mu\text{m}$ 、ポリエチレン—ビニルアルコール共重合体で表面を被覆）を用いて、実施例1と同様の方法により、オリゴヌクレオチドが中空繊維の内壁面に固定化された核酸固定化中空繊維を得た。

【 0 0 4 1 】

実施例 4

核酸固定化繊維配列体の作製：

実施例 1 で得たプローブ A が固定化されたナイロン繊維（参考例 1 の表面処理を行ったもの、長さ 2 0 c m）2 0 本を、テフロン板上に互いに重なることなく且つ密着させて配列し、両端を固定した。これに、ポリウレタン樹脂接着剤（日本ポリウレタン工業（株）コロネート 4403、ニッポラン 4223）を薄く塗布し、ポリウレタン樹脂が十分に固まった後、これをテフロン板上から剥がし、プローブ A が固定化された繊維が一行に配列したシート状物を得た。一方、プローブ B が固定化された繊維についても、同様の操作によりシート状物を得た。次いで、これらのシート状物を図 1（3）の配列となるように 2 0 枚積層し、上記接着剤を使用して接着し、縦横各々 2 0 本ずつ、計 4 0 0 本の繊維が規則的に正方に配列した核酸固定化繊維配列体を得た。

参考例 2 及び 3 により表面処理を行った繊維それぞれに対しても同様の操作により核酸固定化繊維配列体を得た。

さらに、実施例 2 及び 3 で得られた核酸固定化繊維についても、上記と同様にして核酸固定化繊維配列体を得た。

【 0 0 4 2 】

実施例 5

核酸固定化繊維配列体の作製：

実施例 1 で得たプローブ A が固定化された表面処理の異なる 2 種のナイロン中空繊維（長さ 2 0 c m）2 0 本を、それぞれテフロン板上に互いに重なることなく且つ密着させて配列し、両端を固定した。これに、ポリウレタン樹脂接着剤（日本ポリウレタン工業（株）コロネート 4403、ニッポラン 4223）を薄く塗布し、ポリウレタン樹脂が十分に固まった後、これをテフロン板上から剥がしプローブ A が固定化された繊維が一行に配列したシート状物を得た。一方、プローブ B が固定化された繊維についても同様の操作を行った。

【 0 0 4 3 】

次いで、表面処理の同じ繊維同士について、プローブ A が固定化された繊維が

らなるシート状物、プローブBが固定化された繊維からなるシート状物、及び繊維配列体の一行を構成する繊維のうち一部をプローブBが固定化された繊維、残りの一部をプローブAが固定化された繊維としたシート状物を作製した。これらのシート状物を図1(3)に示すように20枚積層し、上記接着剤を使用して接着し、縦横各々20本ずつ、計400本の繊維が規則的に正方に配列した2種の核酸固定化繊維配列体を得た。

さらに、実施例2、3及び4で得られた核酸固定化中空繊維についても、上記と同様にして4種の核酸固定化中空繊維配列体を得た。

【0044】

実施例6

核酸固定化繊維配列体の薄片の作製：

実施例5で得られた核酸固定化繊維配列体を、繊維軸に直角方向にミクロトームを用いて100 μ mの厚さに切り出すことにより、縦横各々20本、計400本の繊維断面が規則的に正方に配列された核酸固定化繊維配列体の薄片を得た(図1(4))。

【0045】

参考例5

試料核酸の標識：

試料核酸のモデルとして、参考例3で合成したオリゴヌクレオチド(プローブA、プローブB)の配列の一部に相補的なオリゴヌクレオチド(C、D)を合成した。

【0046】

オリゴヌクレオチドC：GAGCCCTCGCTCGTACAGCAAGGTTTCG(配列番号3)

オリゴヌクレオチドD：CTGCTGTCCCAAACCCTGACCTCCACC(配列番号4)

これらのオリゴヌクレオチドの5'末端を、参考例3と同様にしてアミノリンクII(商標名)(PEバイオシステムズジャパン社)を用いてそれぞれのオリゴヌクレオチドの5'末端にNH₂(CH₂)₆-を導入した後、以下のようにしてディゴキシゲニン(DIG: Digoxigenin、ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社)で標識した。

【0047】

末端アミノ化されたオリゴヌクレオチドをそれぞれ100 mMホウ酸緩衝液(pH8.5)に終濃度2 mMになるように溶かした。等量のDigoxigenin-3-O-methylcarbonyl-ε-aminocaproic acid-N-hydroxy-succinimide ester (26mg / mlジメチルホルムアミド溶液)を加え、室温にて一晩静置した。

【0048】

量を100 μlに調整し、2 μlのグリコーゲン（ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社）、10 μlの3M酢酸ナトリウム(pH5.2)、300 μlの冷エタノールを加え、15,000rpm 15分の遠心により沈殿を回収した。沈殿に500 μlの70%エタノールを加え15,000rpm 5分の遠心により沈殿を再びチューブの底に集めた。沈殿を風乾し、100 μlの10 mM Tris-HCl (pH7.5), 1 mM EDTAに溶かした。

こうして得られたDIG標識オリゴヌクレオチドを試料核酸のモデルとして用いた。

【0049】

参考例 5

ハイブリダイゼーション:

実施例6で作製した核酸固定化薄片をハイブリダイゼーション用のバッグに入れ、以下の組成からなるハイブリダイゼーション溶液を注ぎ込み、45℃で30分間プレハイブリダイゼーションを行った。

参考例4で得られたDIG標識DNAを加え、45℃で15時間ハイブリダイゼーションを行った。

【0050】

ハイブリダイゼーション溶液組成:

5xSSC(0.75M塩化ナトリウム、0.075Mクエン酸ナトリウム、pH7.0)

5% ブロッキング試薬（ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社）

0.1% N-ラウロイルザルコシンナトリウム

0.02% SDS（ラウリル硫酸ナトリウム）

50%ホルムアミド

【0051】

参考例 6

検出:

ハイブリダイゼーション終了後、核酸固定化薄片を、あらかじめ保温しておいた 50 ml の 0.1 × SSC, 0.1% SDS 溶液に移し、振盪しながら 20 分間の洗浄を 45℃ で 3 回行った。

【0052】

DIG 緩衝液 1 を加え、室温で振盪しながら SDS の除去を行った。これを再度繰り返した後、DIG 緩衝液 2 を加え 1 時間振盪した。緩衝液を除いた後、DIG 緩衝液 2 に 10000 分の 1 量の抗 DIG アルカリフォスファターゼ標識抗体溶液を加えた溶液 10 ml を加え、30 分間ゆっくり振盪させることにより抗原抗体反応を行わせた。次に 0.2% Tween 20 を含む DIG 緩衝液 1 で 15 分間 2 回振盪することにより洗浄し、引き続き DIG 緩衝液 3 に 3 分間浸した。DIG 緩衝液 3 を除いた後、AMPPD を含む DIG 緩衝液 3 ml を加え、10 分間平衡化した。

【0053】

水分をきり、新しいハイブリダイゼーション用バッグに移し、37℃ で 1 時間おいた後、X 線フィルム用のバインダーに X 線フィルムとともに挟みフィルムを感光させた。

その結果、何れも、プローブ A が配置された場所には、オリゴヌクレオチド C が結合し、プローブ B が配置された場所には、オリゴヌクレオチド D が結合していることが確認された。

【0054】

DIG 緩衝液 1 : 0.1 M マレイン酸、0.15 M 塩化ナトリウム (pH 7.5)

DIG 緩衝液 2 : DIG 緩衝液 1 に 0.5% 濃度でブロッキング試薬を添加したものの

DIG 緩衝液 3 : 0.1 M トリス-塩酸 (pH 9.5)、0.1 M 塩化ナトリウム、
0.05 M 塩化マグネシウム

ブロッキング試薬 : 抗 DIG アルカリフォスファターゼ標識抗体溶液および

び AMPPD は DIG Detection キット (ロシュ・ダイアグ
ノスティックス株式会社) 中の試薬である。

【0055】

【発明の効果】

本発明により、核酸が固定化された中空繊維並びに核酸が固定化された中空繊維配列体及びその薄片が提供される。

本発明によれば、核酸が任意に高密度且つ正確に配列された核酸固定化中空繊維配列体の繊維断面を有する薄片を再現性よく効率的に得ることができる。この薄片を用いて、検体中の核酸の種類および量を調べることができる。

【0056】

本発明を従来法と比較した利点、有用性としては、例えば、固定化プロセスを二次元平面上で行わず、一次元構造体としての繊維上で分離・独立して行うことにより、鎖長によらず核酸の定量的固定が可能となったこと、整列化プロセスに各種の繊維腑形化技術、ないし織物作製技術の導入による高密度化が可能となったこと、また、その結果得られる選られる三次元構造体としての繊維束から目的とする二次元配列体を作製するため、従来法にはない薄片化プロセスが新たに導入されたが、それに伴いスポットティング法のような誤差の多い微量分注操作が不要となり、連続切片化を通した多量生産が可能となったこと等があげられる。

【0057】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> MITSUBISHI RAYON CO., LTD.

<120> NUCLEIC ACID-FIXED HOLLOW FIBER, AN ARRAY OF THE FIBERS
AND A SLICE OF THE ARRAY.

<130> P99-0105

<140>

<141>

<160> 4

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 1

gcgatcgaaa ccttgctgta cgagcgaggg ctc

33

<210> 2

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 2

gatgaggtgg aggtcagggt ttgggacagc ag

32

<210> 3

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 3

gagccctcgc tcgtacagca aggtttcg

28

<210> 4

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 4

ctgctgtccc aaaccctgac ctccacc

27

【 0 0 5 8 】

【配列表フリーテキスト】

配列番号 1 : 合成DNA

配列番号 2 : 合成DNA

配列番号 3 : 合成DNA

配列番号 4 : 合成DNA

【図面の簡単な説明】

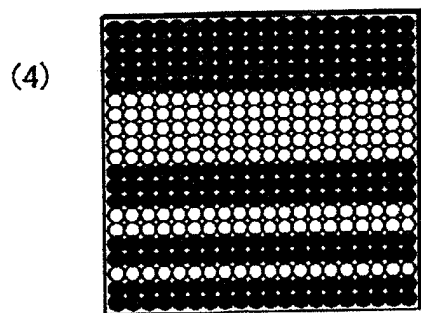
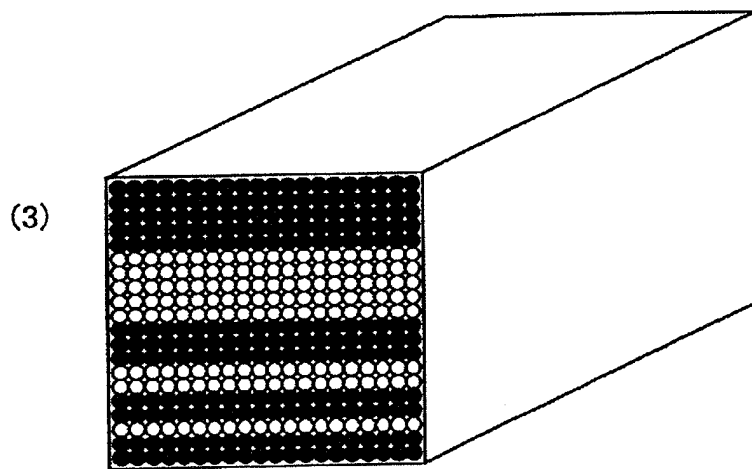
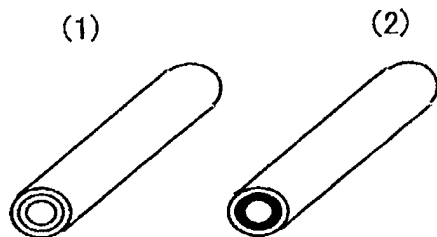
【図 1】

図 1 は核酸固定化中空繊維並びに核酸固定化中空繊維配列体及びその薄片の模式図である。

(1)はプローブ A が固定化された核酸固定化中空繊維、(2)はプローブ B が固定化された核酸固定化中空繊維、(3)はこれら 2 種の核酸固定化中空繊維からなる核酸固定化繊維配列体、及び(4)はこの核酸固定化中空繊維配列体を繊維軸に対して垂直方向に切断した断面を示す。

【書類名】 図面

【図 1】



【書類名】 要約書

【要約】

【解決手段】 核酸固定化中空繊維並びに核酸固定化中空繊維配列体及びその薄片。

【効果】 核酸が任意に高密度且つ正確に配列された核酸固定化中空繊維配列体の繊維断面を有する薄片を再現性よく効率的に得ることができる。この薄片を用いて、検体中の核酸の種類および量を調べることができる。

【選択図】 なし

特平11-059361

出願人履歴情報

識別番号 [000006035]

1. 変更年月日 1998年 4月23日
[変更理由] 住所変更
住 所 東京都港区港南一丁目6番41号
氏 名 三菱レイヨン株式会社